

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER GLUTATHION
IN DER ISOLIERT DURCHSTRÖMTEN LEBER
DER RATTE**

Christine Gerstenecker

1977

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
und Physikalische Biochemie der Universität
München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher,
Prof. Dr. E. M. Klingenberg, Prof. Dr. H. G.
Zachau

UNTERSUCHUNGEN ÜBER GLUTATHION IN DER ISO-
LIERT DURCHSTRÖMTEN LEBER DER RATTE



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Christine Gerstenecker

aus

München

1977

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Sies
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Versmold
Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 1977



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

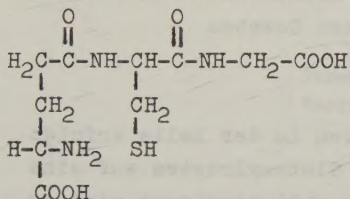
	Seite
1. E I N L E I T U N G	1
2. M E T H O D I K	8
2.1. Perfusion	8
2.2. Analysen	9
2.2.1. Hydroperoxyde	9
2.2.2. Gesamt-Glutathion	9
2.2.3. Glutathiondisulfid	9
2.2.4. Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächen- fluoreszenz	9
2.2.5. Lactat, Pyruvat und Glucose	9
2.2.6. Frierstop und Extraktion Messung der Pyridinnukleotide im Extrakt	10
2.2.7. pH im Effluent	11
2.2.8. Sauerstoffkonzentration im Effluent	11
2.2.9. Hexobarbital	11
2.3. Materialien	13
3. E R G E B N I S S E	14
3.1. Umsatz von tert-Butylhydroperoxyd	16
3.2. Freisetzung von oxydiertem Glutathion	16
3.3. Veränderungen im Pyridinnukleotid-System	18
3.3.1. Gewebsspiegel der Pyridinnukleotide	18
3.3.2. Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächen- fluoreszenz	20
3.4. Veränderungen im Kohlenhydrat-Stoffwechsel	21
3.5. Veränderungen der Sauerstoffaufnahme und des pH im Effluent	22
3.6. Disulfid-Austausch	22
3.7. Einfluß der Glutathion-Oxydation durch Hy- droperoxyde auf die mischfunktionelle Oxy- dation am endoplasmatischen Reticulum	24
3.7.1. Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes durch tert-Butylhydroperoxyd	26
3.7.2. Hemmung der Hexobarbital-bedingten Sauer- stoffmehraufnahme durch tert-Butylhydroper- oxyd	26

4.	D I S K U S S I O N	29
4.1.	Ausstrom von oxydiertem Glutathion aus der Zelle	29
4.2.	Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch tert-Butylhydroperoxyd	31
4.3.	Hemmung der mischfunktionellen Oxydation durch tert-Butylhydroperoxyd	32
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	34
6.	L I T E R A T U R	37
	Anhang: Verwendete Abkürzungen und Enzyme	43

1. EINLEITUNG

Glutathion wurde 1921 erstmals in kristalliner Form aus Hefe isoliert [1]. 1929 konnten Zusammensetzung und Struktur des Tripeptids aufgeklärt werden [2,3]. 1935 wurde es erstmals synthetisiert [4].

Struktur



L-γ-Glutamyl-L-Cysteinylglycin

Glutathion ist ein Tripeptid mit zwei auffallenden Strukturmerkmalen: Es enthält eine γ-Glutamylbindung, die seinen Abbau durch Peptidasen, die spezifisch für Peptidbindungen an α-Aminogruppen sind, zu verhindern scheint, und eine Sulfhydrylgruppe, die entscheidende Bedeutung für seine biologische Funktion besitzt.

Vorkommen

Glutathion wurde in fast allen pflanzlichen und tierischen Geweben in Konzentrationen von 0.4 - 12 mM nachgewiesen. Tab. 1 zeigt einige Beispiele.

Synthese

Glutathion wird unter ATP-Verbrauch aus den Aminosäuren L-Glutamat, L-Cystein und Glycin synthetisiert. Die Synthese erfolgt in zwei Schritten, die durch die Enzyme γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase bzw. Glutathion-Synthetase katalysiert werden [8,9].

Gewebe	Glutathion [mM]	Lit.
menschl. Erythrozyten	ca. 2	[5]
menschl. Linse	3.5 - 1.8 [altersabhängig]	[6]
Rattenleber	5.5 - 9.9	[7]

Tabelle 1: Glutathion-Konzentrationen in
verschiedenen Geweben

Abbau

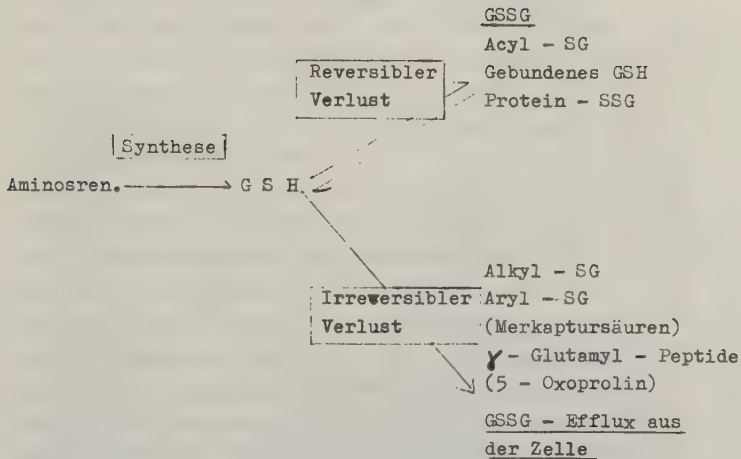
Der Abbau von Glutathion in der Zelle erfolgt durch Übertragung des Glutamylrestes auf eine freie Aminosäure. Dieser Glutamylrest wird zu 5-Oxo-L-Prolin und weiter zu Glutamat abgebaut. Das bei der ersten Reaktion entstandene L-Cysteinylglycin wird in die freien Aminosäuren gespalten [68].

Biologische Halbwertszeit

Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Glutathion ergaben biologische Halbwertszeiten von weniger als vier Stunden in Ratten- und Kaninchenleber [10,11] bis zu etwa drei Tagen in Erythrozyten [12], Linse [13] und Gehirn [11].

GSH-GSSG-System

Glutathion stellt den größten zellulären Pool an freien Sulfhydrylgruppen dar. Hierbei steht reduziertes Glutathion [GSH] in einem Redoxgleichgewicht mit oxydiertem Glutathiondisulfid [GSSG]. Normalerweise ist dabei die Konzentration von GSH weitaus höher als die des GSSG. Eine Übersicht über die verschiedenen Prozesse, die dieses System beeinflussen können, gibt Schema 1.



Schema 1: Reversible und irreversible Prozesse, die das GSH-GSSG-System in der Zelle beeinflussen können [nach 14]

Glutathion ist also unter anderem beteiligt an Disulfid-Austausch-Reaktionen. Es wirkt als Wasserstoff-Donator für die Reduktion von freien Radikalen, verschiedenen Hydroperoxyden und anderen oxydierenden Substanzen. Es besitzt große Bedeutung als Schutzsubstanz für die Sulfhydrylgruppen verschiedener Moleküle, z. B. von Proteinen. Dies hat zur Folge, daß Veränderungen im GSH-GSSG-System mit einer Fülle von biologischen Effekten verbunden sein können, s. Tab. 2.

Während die Oxydation von GSH zu GSSG per se keine Zell- und Membranschäden verursacht, treten pathologische Veränderungen dann auf,

Biologische Effekte	Lit.	Pathologische Veränderungen	Lit.
Abbau und Entgiftung exogener u. endogener Oxydantien durch Konjugation mit GSH	[17,22]	Beeinträchtigung von Entwicklung und Wachstum	[15]
Reduktion exogener Hydroperoxyde unter GSH-Verbrauch	[26]	Hemmung der DNS- u. RNS-Synthese	[23]
Anstieg von GSSG-Äquivalenten im Plasma	[20]	Hemmung der Proteinsynthese	[24]
Freisetzung von GSSG aus den Zellen	[26,32]	Lipidperoxydation u. Proteinde-naturierung mit Zellnekrose	[19]
Oxydation im NADP-System	[26]	makromolekulare Reaktionen mit freien Radikalen	[25]
Freisetzung von Glucose in den ECR	[26]	Hämolyse	[19]
Verminderung der O ₂ -Aufnahme	[26]	Katarakt	[16]
Freisetzung von Neurotransmitter-substanz	[21]	Bestrahlungssyndrome	[18]
Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes durch exogenes Hydroperoxyd			

Schema 2: Mögliche Folgen einer Oxydation im GSH-GSSG-System von Zellen und Organen

2 a: Biologische Effekte

2 b: Pathologische Veränderungen

wenn entweder unter Belastung mit Oxydantien die Fähigkeit der Zelle zur Regeneration von GSH nicht mehr ausreicht, oder wenn aufgrund von Defekten in der Glutathion-Synthese [selten] primär ein erniedrigter Glutathion-Spiegel vorliegt und eine oxydative Belastung der Zelle hinzukommt [19].

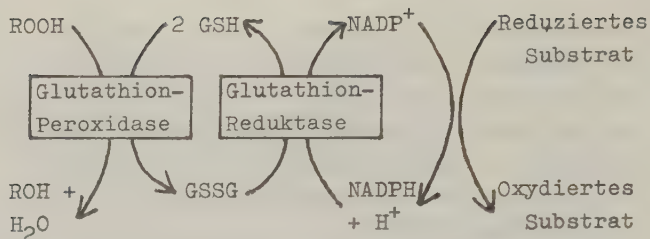
Eine bekannte klinisch manifeste Störung der GSH-Regeneration in Erythrozyten ist beispielsweise der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Hier kommt es bei Belastung mit oxydierenden Substanzen, z. B. Primaquin und Phenylhydrazin-Derivate [27-29], sowie nach Genuß von Fava-Bohnen bzw. Inhalation der entsprechenden Pollen wegen der eingeschränkten GSSG-Reduktion zur Bildung von Heinzschen Innenkörpern und zur Hämolyse [30].

Die GSH-Regeneration hängt, wie auch das obige Beispiel zeigt, von NADPH-liefernden Stoffwechselprozessen ab, s. Schema 2. Als Beispiele für solche Reaktionen im Intermediärstoffwechsel der Zelle seien die der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase [Pentosephosphat-Zyklus], der NADPH-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase und des "malic enzyme" genannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurde experimentell durch Zusatz von Hydroperoxyden der GSH/GSSG-Quotient ["Thiol-Redoxstatus"], wie in Schema 2 angegeben, zugunsten von GSSG verändert.

Endogen entstandene oder von außen zugeführte Hydroperoxyde werden mit Hilfe der Glutathion-Peroxydase zu den entsprechenden Alkoholen abgebaut. H_2O_2 bildet dabei insofern eine Ausnahme, als es auch durch Katalase umgesetzt wird. Bei der Glutathion-Peroxydase-Reaktion werden



Schema 2: Verbindungen des Redoxpaares 2 GSH/
GSSG mit dem Hydroperoxydstoffwechsel
und dem Pyridinnukleotidsystem

pro Mol Hydroperoxyd 2 Mol GSH zu GSSG oxydiert. Das Enzym besitzt eine sehr ausgeprägte Donor-substratspezifität in bezug auf GSH [31]. Eine Spezifität für das Akzeptorsubstrat scheint nicht vorzuliegen. Das Enzym setzt z. B. folgende Substrate um: Linolsäure-, Linolensäure-, Äthyl-, Cumol-, Steroid- und tert-Butylhydroperoxyd. Das oxydierte Glutathiondisulfid wird mit Hilfe der Glutathion-Reduktase wieder zu GSH reduziert. Pro Mol GSSG wird dabei ein Mol $NADPH + H^+$ verbraucht.

Übergänge im Thiol-Redoxstatus wurden bis zum Beginn der vorliegenden Untersuchung vor allem an Erythrozyten [32] und an der Augenlinse [33] untersucht, jedoch nicht an parenchymatösen Organen wie der Leber.

Die Leberzellen enthalten eine hohe Aktivität von Glutathion-Peroxidase, die sich zu $2/3$ im Zytosol und zu $1/3$ in den Mitochondrien befindet [34]. Außerdem liegt in beiden Kompartimenten Glutathion-Reduktase vor, so daß theoretisch im Fließgleichgewicht pro Mol reduziertes Hydroperoxyd ein Mol $NADPH$ verbraucht wird.

Da auch die mischfunktionelle Oxydation am endoplasmatischen Reticulum eine $NADPH$ -verbrauchende Reaktion darstellt, wurde die Frage un-

tersucht, ob eine Beeinflussung dieser Reaktion durch gleichzeitige Gabe von Hydroperoxyden möglich ist.

Die isoliert hämoglobinfrei durchströmte Leber der Ratte stellt ein für diese Fragestellungen geeignetes Untersuchungsmodell dar. Diese Versuchsanordnung ermöglicht besonders einfach eine Trennung der intrazellulären von den extrazellulären Räumen. Veränderungen im Pyridinnukleotid-System können mit Hilfe der Oberflächenfluoreszenz kontinuierlich verfolgt werden. Durch die hämoglobinfreie Durchströmung des Organs werden überlagernde Stoffwechseleffekte von Erythrozyten vermieden und Metabolitmessungen im Perfusat ermöglicht. Tert-Butylhydroperoxyd erwies sich als geeignete Modells substanz zur Beeinflussung des zellulären Glutathion-Systems, da es spezifisch mit Glutathion-Peroxydase umgesetzt wird und da sein Abbauprodukt, tert-Butanol nicht mit der Alkohol-Dehydrogenase reagiert [35].

2. METHODIK

2.1. Perfusion

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 130 - 190 g verwendet, die Altromin-Futter ad libitum erhielten. Die für die Hexobarbital-Versuche benutzten Tiere erhielten vor Versuchsbeginn mindestens sieben Tage lang Phenobarbital [1 mg/ml] mit dem Trinkwasser. Zur Narkose wurde den Tieren 50 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium injiziert. Zur Hemmung der Blutgerinnung erhielten sie 1 000 IE/kg KG Heparin i. v. Nach Freipräparieren der Leber [36] wurde diese mit bicarbonatgepufferter Perfusionslösung hämoglobinfrei durchströmt.

Zusammensetzung der Perfusionslösung: 115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM Na₂SO₄, 25 mM NaHCO₃, sowie Lactat und Pyruvat im Verhältnis 1/1 oder 4/1 zur Aufrechterhaltung eines konstanten Lactat/Pyruvat-Quotienten im zufließenden Perfusat. Diese Lösung wurde in einem thermostatisierten [33° C auf der Leberoberfläche] rotierenden Zylinderoxygenator [37] mit einem Sauerstoff/Kohlendioxyd-Gemisch [95/5, v/v] äquilibriert. Für Versuche unter anoxischen Bedingungen wurde mit einer Gasmischung von 95 % Stickstoff/5 % Kohlendioxyd begast. Das Perfusat durchströmte die Leber mit einer Geschwindigkeit von 3.0 - 3.5 ml x min⁻¹ x g⁻¹ [Leber-Frischgewicht]. Es wurde nicht rezirkuliert [offenes System]. Die für den Versuch benötigten Substanzen wurden mit Hilfe von Mikropräzisionspumpen in das zufließende Perfusat eingebracht.

2.2. Analysen

2.2.1. Hydroperoxyde

Zu 2.0 ml Kaliumphosphatpuffer [0.1 M] pH 7.0 mit 1 mM EDTA wurden 0.5 ml Probe, 0.3 ml GSH [10 mM], 0.1 ml NADPH [5 mM] und 0.1 ml Glutathion-Reduktase [5 mg/ml, 1:50 verdünnt] gegeben. Nach 5 min Inkubation bei 25° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.01 ml Glutathion-Peroxidase [50 U/ml] gestartet. Im Eppendorf-Photometer wurde die Extinktionsänderung bei 366 nm gemessen.

2.2.2. Gesamt-Glutathion

Das Gesamt-Glutathion [GSH + GSSG] wurde in einem Testansatz aus 1 ml Phosphatpuffer [0.1 M] pH 7.0, 0.1 ml Probe, 0.01 ml DTNB-Lösung [4 mg/ml], 0.05 ml NADPH [5 mM] und 0.05 ml Glutathion-Reduktase [5 mg/ml, 1:50 verdünnt] bestimmt. Im Hitachi-Photometer wurde die Extinktionsänderung bei 412 nm gemessen [38].

2.2.3. Glutathiondisulfid

GSSG wurde durch Zugabe von 0.6 U Glutathion-Reduktase zu 0.5 ml Probe, 0.2 ml Triäthanolamin [0.1 M] mit 1 mM EDTA pH 7.6 und NADPH in einer Endkonzentration von 30 - 50 µM bestimmt. Der Abfall der Extinktion bei 340 nm wurde spektrophotometrisch gemessen.

2.2.4. Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächenfluoreszenz

Die Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächenfluoreszenz [Anregung bei 334 nm, Emission bei > 400 nm] wurde kontinuierlich von einem Bereich der Leberoberfläche abgeleitet [37].

2.2.5. Lactat, Pyruvat und Glucose

Lactat, Pyruvat und Glucose wurden nach [39, 40] bei 25° C bestimmt. Es wurden optische

Tests verwendet und die Extinktionsänderung des NADH photometrisch gemessen.

2.2.6. Frierstop und Extraktion

Der vordere linke Leberlappen wurde mit einer auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffs abgekühlten Zange zu einer Platte von etwa 1 mm Dicke und ca. 500 - 800 mg Gewicht zusammengepreßt. Das so erhaltene gefrorene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und wie folgt weiter verarbeitet:

alkalische Extraktion

Die reduzierten Pyridinnukleotide NADH und NADPH sind im sauren pH-Bereich instabil. Sie wurden deshalb mit alkoholischer KOH [0.5 N, -17°C] extrahiert. Anschließend wurde das Gewebematerial hitzedenaturiert [90°C , 5 min] und das Protein bei pH 7.8 abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation [5 min, 30 000 g] ergab sich ein fast klarer Überstand. Wegen der nichtenzymatischen Abnahme wurden die Nukleotide unmittelbar anschließend gemessen.

saure Extraktion

Die oxydierten Pyridinnukleotide NAD und NADP wurden aus dem gefrorenen Gewebepulver durch Extraktion mit 0.6 N Perchlorsäure [Gewebe/Perchlorsäure wie 1/5, w/v] gewonnen [41]. Der Extrakt wurde 10 min zentrifugiert bei 10 000 g, mit 1 N KH_2PO_4 vorneutralisiert, dann mit 2 N KOH auf pH 7.0 gebracht und anschließend die oxydierten Pyridinnukleotide gemessen.

Messung der Pyridinnukleotide im Extrakt

Die Pyridinnukleotide wurden nach [40,42] im optischen Test gemessen. Wegen der geringen Substratkonzentrationen erfolgten die Messungen an einem Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzzusatz.

2.2.7. pH im Effluent

Der pH-Wert wurde mit einer Ingold Ag 7.0-Glaselektrode und einem pH-Meter gemessen und mit Hilfe eines Servogor-Schreibers kontinuierlich aufgezeichnet [43].

2.2.8. Sauerstoffkonzentration im Effluent

Die Sauerstoffkonzentration wurde mittels einer Mikroelektrode vom Clark-Typ [37] gemessen und auf einem Servogor-Schreiber fortlaufend registriert.

2.2.9. Hexobarbital

Die Messung des Hexobarbitals erfolgte modifiziert nach [44].

In einer 50 ml-Glasflasche mit Gummistopfen werden gemischt: 2 ml Probe, 1 ml K-Na-Phosphatpuffer [10 mM] pH 5.5, 30 ml Petroleumbenzin p. a., Siedebereich 60 - 80° C, und ca. 1 g NaCl [zur Absättigung der wäßrigen Phase].

Diese Mischung wird 45 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der Inhalt der Flasche wird 10 min in Polypropylen-Zentrifugenbechern bei 1 000 g zentrifugiert. Dabei bleiben die stärker hydrophilen Metabolite des Hexobarbital in der unteren wäßrigen Phase, während nicht umgesetztes Hexobarbital in die Petroleumbenzinphase übergeht. Von dieser werden 20 ml abpipettiert und mit 4 ml K-Na-Phosphatpuffer [10 mM] pH 11.0, in einer verschlossenen Glasflasche 10 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dabei geht das Hexobarbital in die wäßrige Phase über, die nach erneuter Zentrifugation durch Absaugen der oberen Petroleumbenzinphase mittels einer Wasserstrahlpumpe von dieser getrennt wird.

Das in der Pufferphase enthaltene Hexobarbital wird in einer Quarzküvette bei 240 nm photome-

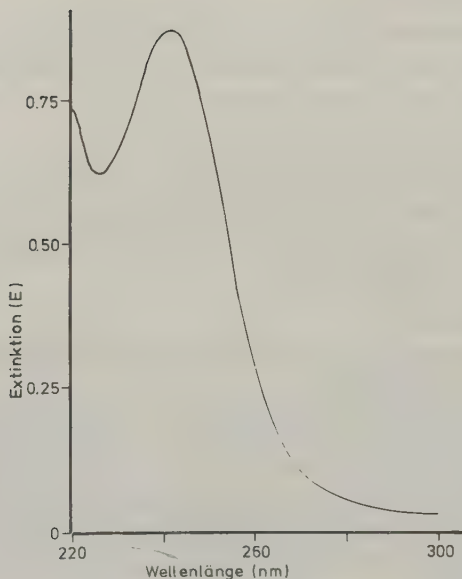


Abbildung 1: Spektrum des Hexobarbitals bei pH 11.0, Konzentration des Hexobarbitals 94 μM .

$$\epsilon_{[240 \text{ nm}, \text{pH } 11.0]} = 9.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

trisch bestimmt. Abb. 1 zeigt das Spektrum des Hexobarbitals bei pH 11.0.

Da die Hexobarbital-Ausbeute unter den genannten Bedingungen nur etwa 60 % betrug, wurden bei jedem Versuch Hexobarbital-Standards mitgemessen und der jeweiligen Konzentrationsberechnung zugrunde gelegt. Abb. 2 zeigt die sich aus den Hexobarbital-Standards ergebende Eichkurve.

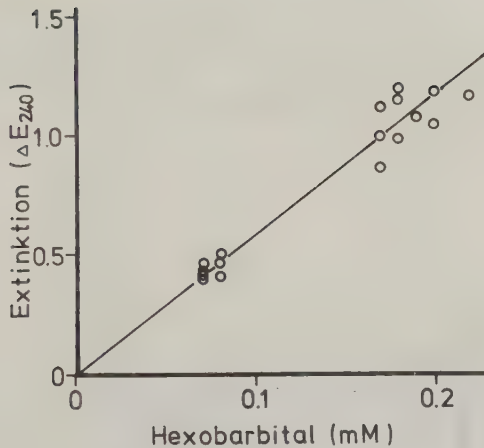


Abbildung 2: Hexobarbital-Eichkurve

2.3. Materialien

Folgende Chemikalien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt: Äthylhydroperoxyd [Ferrosan, Malmö], reduziertes Glutathion [Pharma-Waldhof GmbH, Heidelberg], Hexobarbital-Na [Bayer, Leverkusen], tert-Butylhydroperoxyd und Cumolhydroperoxyd [Peroxydchemie, München].

Alle weiteren verwendeten Enzyme, Coenzyme und Substrate außer L-Milchsäure [Roth, Karlsruhe] stammten von Boehringer, Mannheim. Sämtliche sonstigen Chemikalien außer DTNB [Serva, Heidelberg] wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

3. E R G E B N I S S E

Abb. 3 a,b zeigt den Umsatz von tert-Butylhydroperoxyd, die Freisetzung von Glutathion sowie die zugeordneten Stoffwechselfparameter anhand eines typischen Experiments.

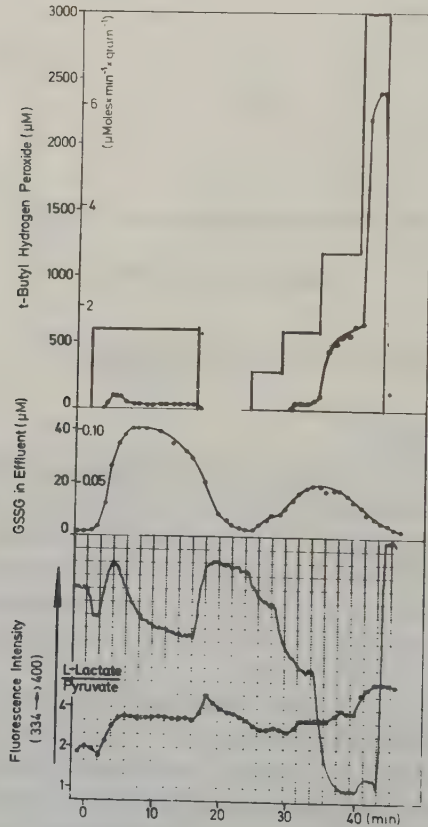


Abbildung 3 a
[Legende s. nächste Seite]

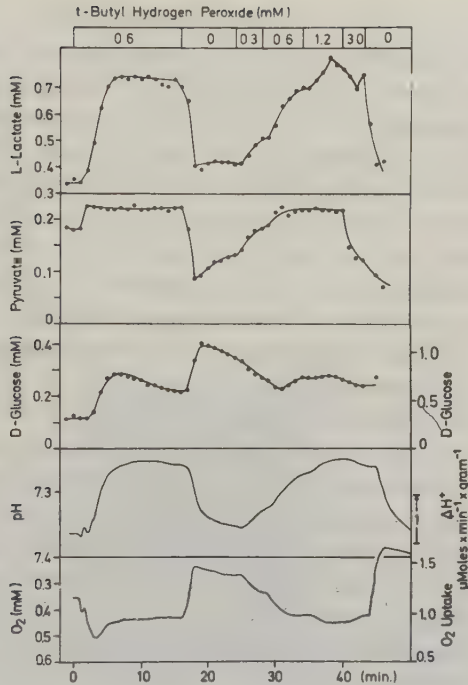


Abbildung 3 b

- 3 a: Infundierte Peroxydkonzentrationen sind als Säulen dargestellt, die t-BOOH-Konzentrationen im Effluent als Punkte. Im mittleren Teil GSSG im Effluent. Auf der Innenseite der Ordinaten die Umsatzraten. Unten Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächenfluoreszenz und L/P im Effluent. L/P im zufließenden Perfusat = 1
- 3 b: Lactat-, Pyruvat-, Glucose- und Sauerstoffkonzentrationen sowie pH im Effluent. Gleicher Versuch wie Abb. 3 a. Umsatzraten auf den Ordinaten an der rechten Bildseite

3.1. Umsatz von tert-Butylhydroperoxyd

Im Versuch der Abb. 3 [s. oberster Abschnitt der Abb. 3 a] wurde bis zur 16. Minute tert-Butylhydroperoxyd mit einer Geschwindigkeit von $1.55 \mu\text{Mol pro min pro g Leber}$ [Frischgewicht] infundiert. Dabei erscheinen nur etwa 3 % des zugeführten Hydroperoxyds im Effluent. Wie im Zeitintervall von 24 - 43 min zu sehen ist, ist bei geringeren Konzentrationen von tert-Butylhydroperoxyd kein Peroxyd im Effluent nachweisbar, während höhere Konzentrationen nicht zu einer weiteren Steigerung der Peroxyd-Umsatzrate führen.

Bei einer Temperatur von 33°C an der Leberoberfläche beträgt die maximale Umsatzrate für tert-Butylhydroperoxyd unter den angegebenen Bedingungen demnach $1.5 \mu\text{Mol pro min pro g Leber}$. Diese maximale Umsatzrate ist temperaturabhängig [45]. Bei 37°C auf der Leberoberfläche beträgt sie etwa $3 \mu\text{Mol pro min pro g Leber}$.

3.2. Freisetzung von oxydiertem Glutathion

In Anwesenheit von zugeführtem Hydroperoxyd wird aus der Leber oxydiertes Glutathion freigesetzt. Dieser Effekt konnte nach Infusion von tert-Butyl-, Cumol- und Äthylhydroperoxyd, sowie nach Gabe von H_2O_2 beobachtet werden. Der mittlere Teil der Abb. 3 a zeigt, daß dies mit einer Maximalrate von $0.1 \mu\text{Mol GSSG pro min pro g Leber}$ [Frischgewicht] erfolgt. Das entspricht etwa 4 % des Gesamt-Glutathions [$\text{GSH} + \text{GSSG}$] in der Leber, das sich auf $5.28 \pm 0.65 \mu\text{Mol pro g Leber}$ beläuft [26]. Im Versuch der Abb. 3 wurden somit $3/4$ des Gesamt-Glutathions im Effluent wiedergefunden. Gegen eine Deutung dieses Effektes als Ausdruck einer allgemeinen Zellschädigung durch das Hy-

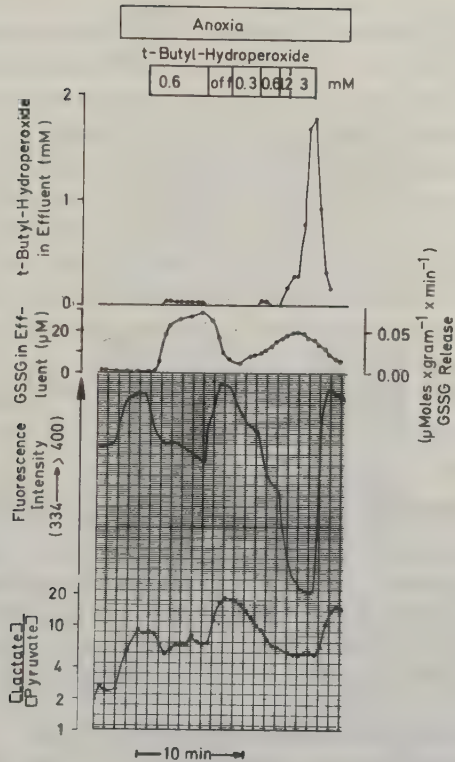


Abbildung 4: Veränderungen in der hämoglobin-frei durchströmten Leber bei Zugabe von t-BOOH unter anoxischen Bedingungen

droperoxyd sprechen vor allem zwei Gründe: Der Glutathiondisulfid-Ausstrom war reversibel und die Lactat-Dehydrogenase, ein Leitenzym für das Zytosol, blieb unter 1 mU/ml wie bei Kontrollperfusionsen ohne Hydroperoxyd. Die Freisetzung von GSSG aus den Leberzellen erfolgte bei Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd auch unter anoxischen Bedingungen, s. Abb. 4.

Der durch die Anoxie bedingte starke Abfall im Verhältnis der Gewebsspiegel von ATP/ADP beeinflusste diesen Effekt nicht signifikant. Auch eine 24-stündige Hungerperiode der Ratten vor Versuchsbeginn, also eine substantielle Verminderung der Glykogenvorräte in der Leber, wirkte sich nicht auf die GSSG-Freisetzung aus.

Intravenöse Injektion von 30 - 40 μ Mol tert-Butylhydroperoxyd bewirkt bei Ratten von 200 - 240 g Körpergewicht eine Zunahme der Plasmakonzentration von GSSG-Äquivalenten von 0 auf 10 μ M fünf Minuten nach der Injektion.

Zu den verschiedenen Hypothesen über den Mechanismus des GSSG-Ausstroms s. u. in der Diskussion.

3.3. Veränderungen im Pyridinnukleotid-System

Die Auswirkungen der Zufuhr von tert-Butylhydroperoxyd auf das Pyridinnukleotid-System in der Leber wurden anhand der Gewebsspiegel, sowie mit Hilfe der Pyridinnukleotid-spezifischen Oberflächenfluoreszenz untersucht.

3.3.1. Gewebsspiegel der Pyridinnukleotide

Die Lebern der Versuchstiere wurden vor dem Frierestop 10 Minuten lang mit 0.6 mM tert-Butylhydroperoxyd durchströmt. Abb. 5 zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH im Effluent während eines solchen Versuchs.

In Tab. 3 sind die Gewebsspiegel der Pyridinnukleotide unter tert-Butylhydroperoxyd im Vergleich zu Kontrollwerten angegeben.

Der NADPH-Spiegel fiel nach zehnminütiger Perfusion mit t-BOOH von 240 auf 153 nMol pro g Leber ab, gleichzeitig stieg der des NADP^+ von 73 auf 158 nMol pro g Leber. Der NADH-Spiegel blieb unverändert, während der des NAD^+ von 541 auf 401 nMol pro g Leber abfiel.

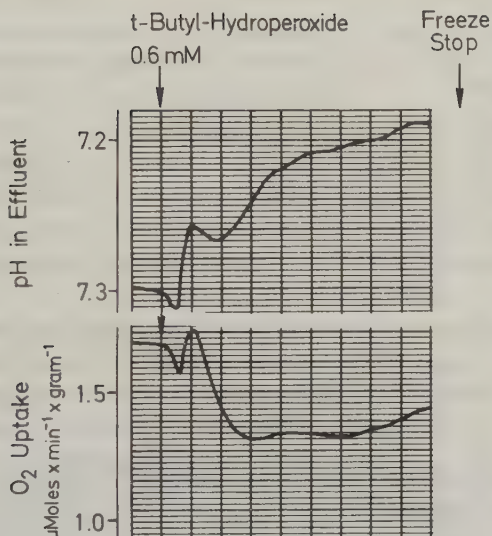


Abbildung 5: Frierstop-Experiment zur Bestimmung der Gewebsspiegel der Pyridinnukleotide. Sauerstoffkonzentration und pH im Effluent zeigen die für t-BOOH typischen Veränderungen.

Der Quotient der Gewebsspiegel sank für NADPH/NADP⁺ von 3.6 ± 0.6 auf 1.2 ± 0.16 . Für NADH/NAD⁺ stieg er dagegen von 0.12 ± 0.015 auf 0.16 ± 0.02 an. Dies stimmt mit den beobachteten Veränderungen des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Effluent [s. Abb. 3 a, unten] und der Pyridinnukleotid-spezifischen Oberflächenfluoreszenz [s. unten] überein.

Die Veränderung des NADPH-Spiegels ist ausgeprägter als jene, die man während hoher Raten von mischfunktioneller Oxydation bei Phenobarbital-vorbehandelten Tieren [46,47] oder bei

Nukleotide u. Metabolite	Kontrollen nMol pro g Leber	0.6 mM t-BOOH [Frischgew.]
NADPH	240 $\pm$ 21	153 $\pm$ 16
NADP ⁺	73 $\pm$ 5	158 $\pm$ 14
NADH	70 $\pm$ 8	66 $\pm$ 6
NAD ⁺	546 $\pm$ 19	401 $\pm$ 24
Gluc-6-P	52 $\pm$ 13	110 $\pm$ 13
Fruc-6-P	19 $\pm$ 3	37 $\pm$ 2

Tabelle 3: Gewebsspiegel von Pyridinnukleotiden und Metaboliten in der isoliert durchströmten Leber der Ratte. Frierestop-Versuche wie in Abb. 5 angegeben. Kontrollen ohne t-BOOH [n=6 - 9] und Werte nach 10 min Perfusion mit 0.6 mM t-BOOH [n=5 - 7], jeweils Mittelwerte $\pm$ SEM

Harnstoffbildung aus Ammoniak [48] findet. Sie stellt somit den größten experimentell erzeugten oxydativen Übergang im NADPH der Leberzelle dar.

3.3.2. Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächenfluoreszenz

Nach Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd zum Perfusat treten charakteristische Veränderungen in der von der Leberoberfläche abgeleiteten Pyridinnukleotid-spezifischen Fluoreszenz auf [s. Abb. 3 a, unten].

Im Intervall von der 24. bis zur 43. Minute fällt die Fluoreszenzintensität während des Umsatzes von tert-Butylhydroperoxyd deutlich ab. Die Größe dieses Intensitätsabfalls ist von der Konzentration des Hydroperoxyds abhängig. Er ist einer Oxydation im NADP-System zuzuschreiben [s. oben]. Der Lactat/Pyruvat-Quotient im

Effluent, der als Indikator für das NAD-System im Zytosol zu betrachten ist, steigt dagegen gering an, was auf eine leichte Reduktion in diesem System hinweist.

Wie das Zeitintervall bis zur 16. Minute zeigt, ruft der Beginn der Infusion von tert-Butylhydroperoxyd einen initialen Abfall der Fluoreszenzintensität hervor, dem ein vorübergehender Anstieg derselben mit einem Gipfel bei 4 Minuten folgt. Gleichzeitig steigt der Lactat/Pyruvat-Quotient im Effluent. In dem genannten Zeitabschnitt wird also die Oxydation im NADP-System von einer Reduktion im NAD-System des Zytosols überlagert.

3.4. Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zwei Hauptenzyme für die NADPH-Regeneration in der Leberzelle. Der Gewebsspiegel des Schlüsselmetaboliten, Glucose-6-Phosphat, steigt nach zehnmütiger Perfusion mit tert-Butylhydroperoxyd von 52 auf 110 nMol pro g Leber [Feuchtgewicht] an [s. Tab. 3]. Gleichzeitig ist ein Anstieg des Gewebsspiegels von Fructose-6-Phosphat, einem Metaboliten der Glykolysekette, zu beobachten. Diese Veränderungen gehen einher mit einer gesteigerten Freisetzung von Glucose aus der Leber und einer Mehrfreisetzung von Lactat und Pyruvat, den Endprodukten der Glykolyse.

Diese Beobachtungen lassen sich durch die Annahme einer erhöhten Glykogenolyserate und Glykolyserate während des Hydroperoxyd-Umsatzes erklären. Auch könnte die unter diesen Bedingungen erhöhte Konzentration von Glutathiondisulfid eine Steigerung des Umsatzes im Pentosephosphat-Zyklus bewirken. Nach Eggle-

ston und Krebs [49] ist die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter physiologischen Bedingungen fast völlig durch NADPH inhibiert und GSSG vermag mit Hilfe eines Cofaktors dieser Inhibition entgegenzuwirken.

3.5. Veränderungen des pH und der Sauerstoffkonzentration im Effluent

Während der Infusion von tert-Butylhydroperoxyd kommt es zu einem Abfall des pH im Effluent, d. h. zu einer erhöhten Freisetzung von Säureäquivalenten aus der Leber [s. Abb. 3 b]. Diese beruht auf der Freisetzung von oxydiertem Glutathion, Lactat und Pyruvat aus den Zellen.

Nach Zugabe von Hydroperoxyd zum Perfusat steigt die Sauerstoffkonzentration im Effluent merklich an. Es kommt also zu einer verminderten Sauerstoffaufnahme durch die Leber, der nach Absetzen des Hydroperoxyds eine deutliche O_2 -Mehraufnahme folgt.

Zur Deutung dieses Effekts s. Diskussion.

3.6. Disulfid-Austausch

Die Zugabe einer Dithiol-Verbindung, z. B. Dithioerythrit, zum zufließenden Perfusat vor Infusion von tert-Butylhydroperoxyd führt zu einem wenig ausgeprägten monophasischen Abfall der Intensität der Pyridinnukleotid-spezifischen Oberflächenfluoreszenz [s. Abb. 6], anstatt der sonst beobachteten charakteristischen biphasischen Veränderung derselben [vgl. Abb. 3 a]. Auch findet keine vermehrte Freisetzung von Glucose aus den Leberzellen statt, wenn das Hydroperoxyd in Gegenwart von Dithioerythrit infundiert wird. Nach Absetzen des Dithiols entsteht ein deutlicher weiterer Abfall der Oberflächenfluoreszenz und es kommt

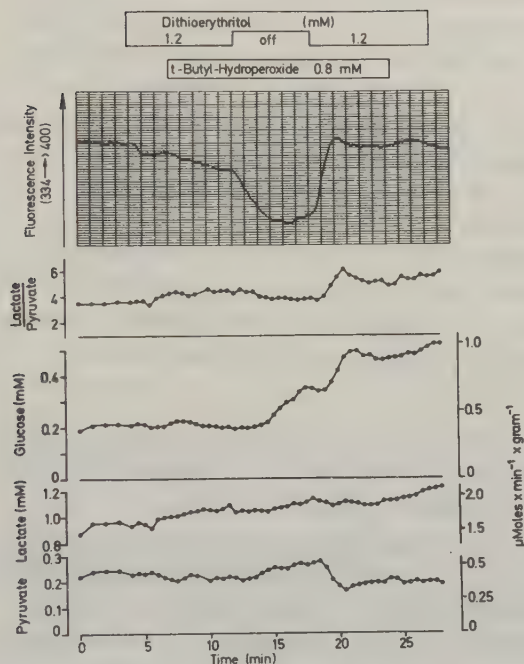


Abbildung 6: Unterdrückung der für t-BOOH charakteristischen Veränderungen der Pyridinnukleotid-spezifischen Oberflächenfluoreszenz und der Glucose-Mehrfreisetzung durch Infusion von Dithioerythrit

zur Mehrfreisetzung von Glucose aus der Leber. Dies läßt darauf schließen, daß der Disulfid-Austausch zwischen dem zugeführten Dithiol und dem an der Glutathion-Peroxidase gebildeten GSSG einige der Hydroperoxyd-bedingten Stoffwechselveränderungen zu unterdrücken vermag. Die Infusion von Cystamin, dem Disulfid des

Cysteamin führte allein jedoch nicht zu einer gesteigerten Freisetzung von Glucose aus der perfundierten Leber. An der lebenden Ratte wurde jedoch die Erzeugung einer Hyperglykämie durch intraperitoneale Injektion von Cystamin beschrieben [50]. Dieser Effekt wurde einer Steigerung der Glykogenolyse durch einen $\beta \rightarrow \alpha$ -Übergang der Phosphorylase zugeschrieben.

Die oben genannten Beobachtungen stellen ein weiteres Indiz dafür dar, daß der Redoxzustand des Glutathion-Paares an der Regulation von Glykogenolyse und Glykolyse beteiligt sein könnte.

3.7. Einfluß der Glutathion-Oxydation durch Hydroperoxyde auf die mischfunktionelle Oxydation am endoplasmatischen Reticulum

Nach Schema 2 besteht für den Peroxyd-Umsatz eine 1 : 1 : 1 Stöchiometrie zwischen Hydroperoxyd-Reduktion, GSSG-Bildung und NADPH-verbrauch. Die vom Cytochrom P 450 abhängige Oxydation von Medikamenten und anderen exogenen Substraten stellt ebenfalls eine NADPH-verbrauchende Reaktion dar. Daher könnte durch den Verbrauch von Reduktionsäquivalenten bei der Disulfid-Reduktion der Umsatz am Cytochrom P 450 vermindert werden.

Die für die nachstehend beschriebenen Versuche verwendeten Ratten wurden mit Phenobarbital vorbehandelt, [s. Abschn. 2.1.], um den Umsatz im System der mischfunktionellen Oxydation zu induzieren [51]. Als Substrat wurde Hexobarbital gewählt und dessen Umsatz gemessen, sowie die Sauerstoffaufnahme durch die isoliert durchströmte Leber der Ratte kontinuierlich aufgezeichnet.

Die halbmaximale Konzentration für Hexobarbi-

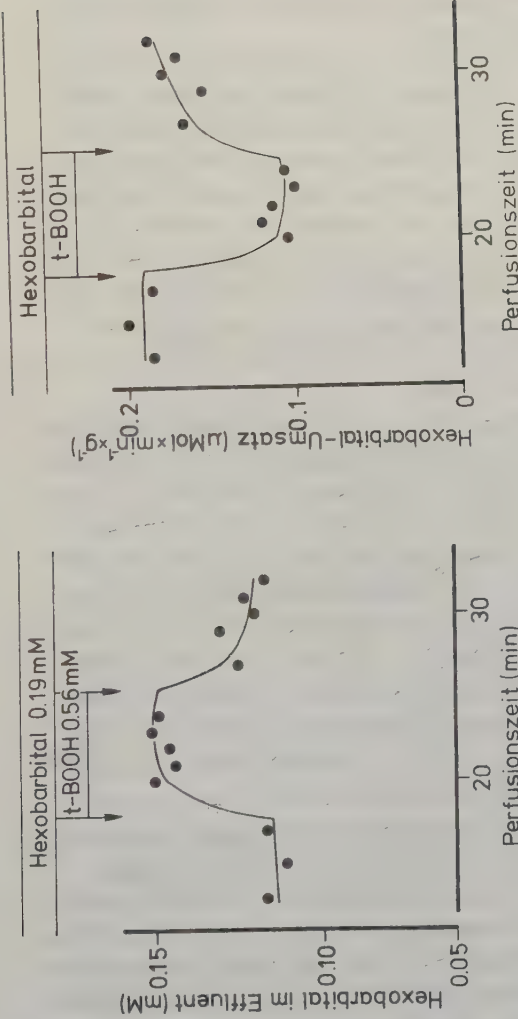


Abbildung 7: Hemmung der mischfunktionellen Oxydation durch tert-Butylhydroperoxyd
links: Hexobarbital-Konzentration im Effluent
rechts: Hexobarbital-Umsatz in $\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ Leber [Hex-Infusion
 $0.48 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, t-BOOH-Infusion $1.4 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$]

tal in Bezug auf die Sauerstoffmehraufnahme, $K_m [O_2]$, ist $59 \mu M$ [46]. In den nachstehenden Versuchen wurde Hexobarbital in einer Konzentration von $0.18 - 0.2 \text{ mM}$ zugegeben.

3.7.1. Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes durch tert-Butylhydroperoxyd

Abb. 7 zeigt links die Hexobarbital-Konzentration im Effluent. Sie steigt unter Gabe von 0.56 mM tert-Butylhydroperoxyd deutlich an und geht nach Absetzen des Peroxyds nahezu auf den ursprünglichen Wert zurück. Rechts in der Abb. 7 ist der Hexobarbital-Umsatz in $\mu\text{Mol pro min pro g Leber [Frischgewicht]}$ dargestellt. Er betrug unter den genannten Bedingungen vor Hydroperoxyd-Gabe im Mittel $0.205 \pm 0.015 \mu\text{Mol pro min pro g Leber [n=10, Mittelwert} \pm \text{SEM}]$.

Bei Gabe von $1.15 \pm 0.26 \mu\text{Mol t-BOOH pro min pro g Leber}$ ist die Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes nahezu vollkommen reversibel. Sie beträgt in diesem Dosisbereich im Mittel $0.05 \pm 0.01 \mu\text{Mol Hexobarbital pro} \mu\text{Mol tert-Butylhydroperoxyd}$. Der Hexobarbital-Umsatz beträgt nach Absetzen des Hydroperoxyds $90.9 \pm 2.25 \%$ [n=7, Mittelwert $\pm$ SEM] des ursprünglichen. Die Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes nimmt mit steigender Hydroperoxyd-Konzentration zu [s. Abb. 8], jedoch langsamer als die t-BOOH-Konzentration.

3.7.2. Hemmung der Hexobarbital-bedingten Sauerstoffmehraufnahme durch tert-Butylhydroperoxyd

Die Infusion von Hexobarbital führt zu einem deutlichen Absinken der Sauerstoff-Konzentration im Effluent, d. h. zu einer Sauerstoffmehraufnahme durch die isoliert durchströmte Leber während der mischfunktionellen Oxydation [s. Abb. 9]. Diese Mehraufnahme betrug in den

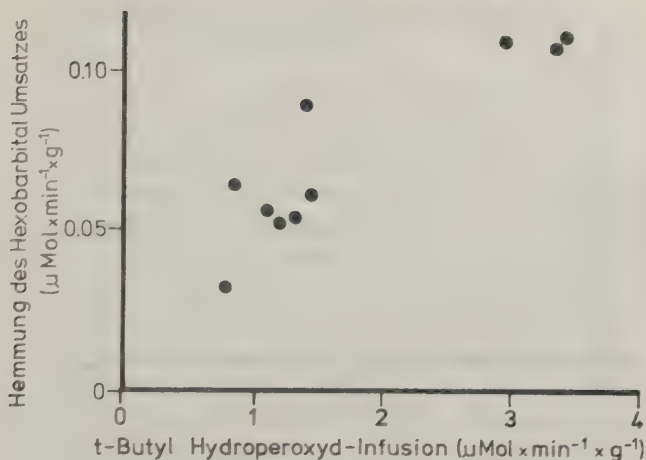


Abbildung 8: Abhängigkeit der Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes von der zugegebenen Hydroperoxyd-Dosis

hier beschriebenen Versuchen $2.01 \pm 0.18 \mu\text{Mol O}_2$ pro μMol Hexobarbital-Umsatz [$n=7$, Mittelwert $\pm$ SEM] und entsprach damit dem in [46] beschriebenen Wert. Die Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd bewirkt eine reversible Hemmung dieser Sauerstoffmehraufnahme [s. Abb. 9], gleichzeitig mit der oben beschriebenen Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes.

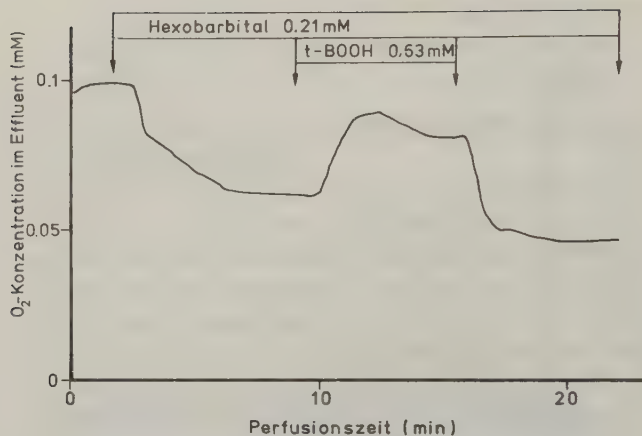


Abbildung 9: Sauerstoff-Konzentration im Effluent während Infusion von Hexobarbital und t-BOOH

4. DISKUSSION

4.1. Ausstrom von oxydiertem Glutathion aus der Zelle

Ein Ausstrom von GSSG in den Extrazellulär-
raum während einer experimentell erzeugten
Oxydation im Glutathion-System wurde auch
an verschiedenen anderen Geweben und Zellen
beobachtet. Neben organischen Hydroperoxyden
[s. vorliegende Arbeit, sowie 20,32,54] wur-
den dabei unter anderem folgende oxydieren-
den Substanzen verwendet: H_2O_2 [52,55], Ty-
rosin plus Tyrosinase [33], Diazide und Azo-
ester [14,19], N^2 -substituierte Methylhydra-
zine [Natulan] plus Fe^{2+} -EDTA [55] und Rönt-
genstrahlen [55].

Ein solcher GSSG-Ausstrom in den Extrazellu-
lärraum unter oxydativer Belastung mit H_2O_2
und organischen Hydroperoxyden wurde an Ery-
throzyten von Patienten mit Glucose-6-Phos-
phat-Dehydrogenase-Mangel und an normalen
Erythrozyten festgestellt [52,53]. Die Zuga-
be von Tyrosin plus Tyrosinase rief den glei-
chen Effekt, verbunden mit Kataraktbildung,
an der Augenlinse von Kaninchen hervor [33].
Durch organische Hydroperoxyde konnte auch
an der isoliert durchströmten Lunge der Rat-
te eine Freisetzung von oxydiertem Glutathi-
on aus den Zellen hervorgerufen werden [54].

Über den Mechanismus dieses GSSG-Transportes
bestehen verschiedene Hypothesen. Einigkeit
besteht darüber, daß GSSG nur unidirektional,
d. h. aus den Zellen in den Extrazellulärraum
transportiert wird. Die Zugabe hoher Konzen-
trationen von GSSG zum Suspensionsmedium ver-
ursachte bei isolierten Hepatozyten keine Än-
derung der Pyridinnukleotid-spezifischen Fluo-

reszenz [56]. Exogen zugeführtes GSSG wurde von Erythrozyten nicht aufgenommen [52].

Auch in einer Perfusionsstudie mit radioaktiv markiertem GSSG und GSH wurde keine Aktivitätsaufnahme in die Zellen beobachtet [59].

Die Gabe verschiedener γ -Glutamyl-peptide, u. a. von Glutathion, bewirkte in der Mäuseleber keinen Anstieg von Glutamat, Glutamin oder Pyrrolidincarboxylat [57].

Dies weist darauf hin, daß die Leberzellmembranen für exogen zugeführte γ -Glutamylpeptide weitgehend impermeabel sind. Ferner konnte nachgewiesen werden, daß aus der isoliert durchströmten Rattenleber unter Infusion von Hydroperoxyden kein reduziertes Glutathion in den Extrazellulärraum freigesetzt wird [58]. Dies stellt einen weiteren Beweis dafür dar, daß die GSSG-Freisetzung nicht auf eine allgemeine Zellschädigung zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, daß der GSSG-Transport aus den Zellen auch gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen kann [32,52], könnte auf einen aktiven Transportmechanismus hinweisen. Auch wurde eine starke Hemmung der GSSG-Freisetzung aus Erythrozyten beschrieben, wenn dem Suspensionsmedium 2 mM Natriumfluorid zugegeben wurde [32,52].

Unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen verursachten an der isoliert durchströmten Rattenleber weder Anoxie [und der damit verbundene Abfall der energiereichen Phosphate] noch eine 24-Stunden-Hungerperiode vor Versuchsbeginn [also eine weitgehende Entleerung der Glykogenvorräte in der Leber] eine signifikante Veränderung der GSSG-Freisetzung aus den Zellen.

Nach einer anderen Untersuchung [54] nimmt der GSSG-Ausstrom aus isoliert durchströmten Lebern und Lungen von Ratten mit Tokopherolmangel leicht zu, wenn diese einer zusätzlichen Hungerperiode ausgesetzt wurden. Die Frage, ob das GSSG-Transportsystem energieabhängig ist, läßt sich also gegenwärtig noch nicht abschließend beantworten.

4.2. Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch tert-Butylhydroperoxyd

Der initiale Abfall der Sauerstoffaufnahme durch die Leber in Anwesenheit von tert-Butylhydroperoxyd ist begleitet von einem Anstieg von Glucose, Lactat und Pyruvat im Perfusat, also einer gesteigerten Glykolyse und wahrscheinlich auch Glykogenolyse. Phänomenologisch könnte dies als Crabtree-Effekt angesehen werden, also als eine Hemmung der Atmung durch aerobe Glykolyse. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Atmungshemmung und der Steigerung der Glykolyse muß jedoch noch nachgewiesen werden.

In isolierten Rattenlebermitochondrien wurde die State-3- und State-4-Atmung [60] mit α -Ketoglutarat [oder Pyruvat] in Anwesenheit von Malonat durch Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd gehemmt, nicht jedoch diejenige mit Glutamat [oder Isocitrat, Malat, Hydroxybutyrat] als Substrat [61]. Dies weist auf eine reversible Hemmung des Metabolit-Durchflusses in Lipoamid-abhängigen Stoffwechselwegen hin.

Diskutiert wurde auch eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch den raschen Einbau anorganischen Phosphats in Form phosphorylierter Glykolyse-Zwischenprodukte infolge der Glykogen-Phosphorolyse. Anorganisches Phos-

phat wurde als geschwindigkeitsbegrenzende Komponente bei der Fructose-induzierten Atmungshemmung in der perfundierten Leber angesehen [62]. Außerdem wurde über eine Hemmung des Phosphat-Ein- und -Ausstroms in Mitochondrien durch niedrige Konzentrationen von Sulfhydrylverbindungen berichtet [63]. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, daß die Oxydation im Glutathion-System keinen Einfluß auf den Phosphat-Transport an der inneren Mitochondrienmembran hat [64]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die Hemmung NADPH-abhängiger Oxydationsprozesse durch den hohen Verbrauch von Reduktionsäquivalenten während des Hydroperoxyd-Umsatzes. Ein Indiz hierfür könnte die Hydroperoxyd-bedingte Hemmung der Sauerstoffmehraufnahme während des Hexobarbital-Umsatzes sein.

4.3. Hemmung der mischfunktionellen Oxydation durch tert-Butylhydroperoxyd

Die mischfunktionelle Oxydation am endoplasmatischen Reticulum stellt, wie bereits in 3.7. erwähnt, eine NADPH-verbrauchende Reaktion dar. Untersuchungen mit Hexobarbital [46,47] und Aminopyrin [65] als Substrat ergaben, daß diese Reaktion eine Oxydation des extramitochondrialen und möglicherweise auch des mitochondrialen NADPH bewirkt. Die Harnstoffsynthese aus Ammoniak [ein Prozeß, bei dem mitochondriales NADPH verbraucht wird] führt bei gleichzeitigem Hexobarbital-Umsatz zu einem zusätzlichen Abfall im NADPH-spezifischen Absorptions-Differenzspektrum [48], was auf die Bedeutung des extramitochondrialen NADPH für die mischfunktionelle Oxydation hinweist.

Der Umsatz von tert-Butylhydroperoxyd führt

ebenso wie der des Hexobarbital zu einem hohen Verbrauch von NADPH in der Zelle. Dies wurde sowohl durch die Abnahme der Pyridin-nukleotid-spezifischen Oberflächenfluoreszenz, wie auch durch den Abfall des NADPH-Spiegels [s. 3.3.] nachgewiesen.

Die beobachtete Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes durch Zugabe von tert-Butylhydroperoxyd ließe sich demnach als Folge eines NADPH-Mangels an der mischfunktionellen Oxidase erklären, hervorgerufen durch den hohen Verbrauch von Reduktionsäquivalenten bei der Disulfid-Reduktion. Eine ähnliche Hemmung wurde auch bei der Harnstoffsynthese aus Ammoniak beobachtet [66].

Zu diskutieren wäre auch eine Hemmwirkung des Hydroperoxyds auf das Cytochrom P 450, da ein Übergang dieses Cytochroms in die inaktive Form nach Lipidperoxydation in der Mikrosomenfraktion beschrieben wurde [67].

Die Klärung dieser Fragen erfordert noch weitere Untersuchungen.

Die Anwendung organischer Hydroperoxyde an der isoliert durchströmten Leber der Ratte erwies sich als geeignetes Modell für die Untersuchung von Übergängen im Thiol-Redoxstatus in intakten Zellen. Da organische Hydroperoxyde in den hier verwendeten Konzentrationen nicht zu einer allgemeinen Zellschädigung führen und Glutathion-Peroxydase in sehr vielen Zellarten vorhanden ist, könnte eine Anwendung auf andere biologische Systeme vorteilhaft sein und weitere Aufschlüsse über biologische Veränderungen erbringen, die durch eine Oxydation im Glutathion-System ausgelöst werden. Eine erste Untersuchung an Erythrozyten wurde bereits beschrieben [32].

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Veränderungen im Glutathion-Redoxstatus der Leberzellen unter Einwirkung von tert-Butylhydroperoxyd, sowie deren Auswirkungen auf verschiedene Stoffwechselprozesse wurden an der isoliert durchströmten Leber der Ratte untersucht.
2. tert-Butylhydroperoxyd wurde von der Leber mit einer Maximalrate von $1.5 \mu\text{Mol pro min pro g Leber}$ [33°C auf der Leberoberfläche] umgesetzt.
3. Die Hydroperoxyd-Reduktion verursacht eine Oxydation im Glutathion-System und eine Freisetzung von GSSG aus den Leberzellen in das Perfusat. In Gegenwart von tert-Butylhydroperoxyd wurden maximal $0.1 \mu\text{Mol GSSG pro min pro g Leber}$ freigesetzt, was etwa 4 % des Gesamt-Glutathions entspricht. Dieser GSSG-Ausstrom fand auch unter anoxischen Bedingungen und bei vorangegangener 24-stündiger Hungerperiode statt.

Am intakten Tier bewirkte die intravenöse Injektion von 30 - 40 $\mu\text{Mol t-BOOH}$ eine Zunahme der Plasmakonzentration von GSSG-Äquivalenten von 0 auf 10 μM .
4. Die Pyridinnukleotid-spezifische Oberflächenfluoreszenz fiel unter Hydroperoxyd-Gabe ab. Dieser Effekt ist einer Oxydation des NADPH zuzuschreiben. Der Lactat/Pyruvat-Quotient im Perfusat stieg dagegen leicht an, was auf eine leichte Reduktion im NAD-System hinweist. Die Messung der Gewebsspiegel der Pyridinnukleotide bestätigte diese Beobachtungen.

5. Die Gabe von tert-Butylhydroperoxyd verursacht eine Mehrfreisetzung von Glucose, Lactat und Pyruvat aus der Leber. Außerdem steigen die Gewebsspiegel von Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat an. Diese Befunde sprechen für eine gesteigerte Glykogenolyse- und Glykolyserate während des Hydroperoxyd-Umsatzes.
6. Die reversible Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch tert-Butylhydroperoxyd erscheint phänomenologisch als Crabtree-Effekt. Sie könnte durch eine reversible Hemmung Lipoamid-abhängiger Stoffwechselwege oder durch eine Hemmung NADPH-abhängiger Oxydationen erklärt werden. Auch die Sauerstoffmehraufnahme während der mischfunktionellen Oxydation wird durch tert-Butylhydroperoxyd gehemmt.
7. Die Infusion von Dithiolverbindungen vor der Hydroperoxyd-Gabe unterdrückt die Mehrfreisetzung von Glucose, Lactat und Pyruvat aus der Leber, sowie die charakteristischen Veränderungen in der Pyridin-nukleotid-spezifischen Oberflächenfluoreszenz. Dies könnte auf eine Beteiligung des Glutathion-Redoxstatus an der Regulation von Glykogenolyse und Glykolyse hinweisen.
8. tert-Butylhydroperoxyd führt zu einer reversiblen Hemmung des Hexobarbital-Umsatzes in der Leber. Diese könnte durch einen NADPH-Mangel an der mischfunktionellen Oxidase, hervorgerufen durch den hohen Verbrauch von NADPH bei der GSSG-Reduktion, erklärt werden oder durch eine Hemmwirkung des Hydroperoxyds auf das Cytochrom P 450.
9. Organische Hydroperoxyde erscheinen auch zur

Untersuchung von Übergängen im Thiol-Redox-status und den damit verbundenen biologischen Veränderungen an anderen Zell- und Gewebsarten geeignet.

6. L I T E R A T U R

- [1] Hopkins, F. G. [1921] Biochem. J. 15, 286 - 305.
- [2] Hopkins, F. G. [1929] J. Biol. Chem. 84, 269 - 320.
- [3] Kendall, E. C., McKenzie, B. F. & Mason, H. L. [1929] J. Biol. Chem. 84, 657 - 674.
- [4] Harington, C. R. & Mead, T. H. [1935] Biochem. J. 29, 1602 - 1611.
- [5] Beutler, E., Duron, O. & Kelly, B. M. [1963] J Lab. Clin. Med. 61, 882 - 888.
- [6] Harding, J. J. [1970] Biochem. J. 117, 957 - 960.
- [7] Davidson, B. E. & Hird, F. J. R. [1964] Biochem. J. 93, 232 - 236.
- [8] Mazia, D. [1954] in Glutathione [Columbia, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadtman, E. & Waelsh, H., eds.] pp. 209 - 222, Academic Press, New York.
- [9] Kosower, E. M. [1972] Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 3292 - 3296.
- [10] Waelsh, H. & Rittenberg, D. [1941] J. Biol. Chem. 139, 761 - 774.
- [11] Douglas, J. W. & Mortensen, R. A. [1956] J. Biol. Chem. 221, 581 - 585.
- [12] Mortensen, R. A., Haley, M. J. & Elder, H. A. [1955] J. Biol. Chem. 218, 269 - 273.

- [13] McMillan, P. J., Ryerson, S. J. & Mortensen, R. A. [1959] Arch. Biochem. Biophys. 81, 119 - 123.
- [14] Kosower, E. M. & Kosower, N. S. [1976] in Glutathione: Metabolism and Function [Arias, I. M. & Jakoby, W. B., eds.] pp. 139 - 150, Raven Press, New York.
- [15] Kosower, E. M. & Kosower, N. S. [1974] in Glutathione [Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H., Waller, H. D. & Wendel, A., eds.] pp. 276 - 287, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [16] Harding, J. J. [1973] Exp. Eye Res. 17, 377 - 383.
- [17] Brodie, B. B., Reid, W. D., Cho, A. K., Sipes, G., Krishna, G. & Gillette, J. R. [1971] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 160 - 164.
- [18] Modig, H. [1968] Biochem. Pharmacol. 17, 177 - 186.
- [19] Kosower, E. M. & Kosower, N. S. [1974] in Glutathione [Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H., Waller, H. D. & Wendel, A., eds.] pp. 216 - 227, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [20] Sies, H., Gerstenecker, C., Summer, K. H., Menzel, H. & Flohé, L. [1974] in Glutathione [Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H., Waller, H. D. & Wendel, A., eds.] pp. 261 - 275, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [21] Werman, R., Carlen, P. L., Kushnir, M. & Kosower, E. M. [1971] Nature [New Biol.] 233, 120 - 121.
- [22] Chasseaud, L. F. [1972] For. Comp. Metab. Mammals. 2, 66 - 162.

- [23] Zehavi-Willner, T., Wax, R. & Kosower, E. M. [1970] FEBS Lett. 9, 100 - 102.
- [24] Kosower, N. S., Vanderhoff, G. A. & Kosower, E. M. [1972] Biochim. Biophys. Acta 272, 623 - 637.
- [25] Power, J. A., Goldstein, L. S. & Harris, J. W. [1974] Int. J. Radiat. Biol. 26, 91 - 96.
- [26] Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. & Flohé, L. [1972] FEBS Lett. 27, 171 - 175.
- [27] Carson, P. E., Flanagan, C. L., Ickes, C. E. & Alving, A. S. [1956] Science 124, 484 - 486.
- [28] Beutler, E. [1957] J. Lab. Clin. Med. 49, 84 - 89.
- [29] Beutler, E., Dern, R. J. & Alving, A. S. [1954] J. Lab. Clin. Med. 44, 177 - 184.
- [30] Jaffe, E. R., [1970] Blood 35, 116 - 120.
- [31] Flohé, L., Schlegel, W., & Schaich, E. [1970] Z. klin. Chem. 8, 149 - 160.
- [32] Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1974] Biochem. J. 139, 289 - 295.
- [33] Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1969] Biochem. J. 112, 421 - 425.
- [34] Flohé, L. & Schlegel, W. [1971] Z. Physiol. Chem. 352, 1401 - 1410.
- [35] Little, C. & O'Brian, P. J. [1968] Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 145 - 150.
- [36] Scholz, R. & Bücher, Th. [1965] in Control of Energy Metabolism [Chance, B.,

- Estabrook, R. W. & Williamson, J. R., eds.] pp. 393 - 413, Academic Press, London, New York.
- [37] Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. & Sies, H. [1972] Eur. J. Biochem. 27, 301 - 317.
- [38] Owens, C. W. J. & Belcher, R. V. [1965] Biochem. J. 94, 705 - 711.
- [39] Hohorst, H. J., Kreuz, F. H. & Bücher, Th. [1959] Biochem. Z. 332, 18 - 46.
- [40] Bergmeyer, H. U., ed. [1974] Methoden der Enzymatischen Analyse, 3rd edn., Verlag Chemie, Weinheim.
- [41] Klingenberg, M. [1970] in Methoden der Enzymatischen Analyse, 2nd edn., vol. II, pp. 1975 - 2004, Verlag Chemie, Weinheim.
- [42] Summer, K. H. [1973] Diplomarbeit, Tübingen.
- [43] Sies, H. & Noack, G. [1972] FEBS Lett. 22, 193 - 196.
- [44] Brodie, B. B., Burns, J. J., Mark, L. C., Lief, P. A., Bernstein, E. & Papper, E. M. [1953] Pharmacol. Exp. Ther. 109, 26 - 48.
- [45] Sies, H. & Summer, K. H. [1975] Eur. J. Biochem. 57, 503 - 512.
- [46] Sies, H. & Brauser, B. [1970] Eur. J. Biochem. 15, 531 - 540.
- [47] Sies, H. & Kandel, M. [1970] FEBS Lett. 9, 205 - 208.
- [48] Sies, H., Häussinger, D. & Großkopf, M. [1974] Z. Physiol. Chem. 355, 305 - 320.

- [49] Eggleston, L. V. & Krebs, H. A. [1974] Biochem. J. 138, 425 - 435.
- [50] Duyckaerts, C., Gilles, L. & Liebcq, C. [1971] J. de Physiologie 63, 207 A.
- [51] Remmer, H. [1958] Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 233, 173 - 183.
- [52] Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1969] J. Biol. Chem. 244, 9 - 16.
- [53] Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1969] Biochem. J. 114, 833 - 837.
- [54] Nishiki, K., Jamieson, D., Oshino, N. & Chance, B. [1976] Biochem. J. 160, 343 - 355.
- [55] Aebi, H. & Suter, H. [1974] in Glutathione [Flohé, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H., Waller, H. D. & Wendel, A., eds.] pp. 192 - 199.
- [56] Sies, H., Summer, K. H. & Großkopf, M. [1976] in Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies [Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., eds.] pp. 317 - 322, North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- [57] Orłowski, M. & Wilk, S. [1976] Eur. J. Biochem. 71, 549 - 555.
- [58] Menzel, H. [1973] Doktorarbeit, Tübingen.
- [59] Hahn, R. [1976] Doktorarbeit, Tübingen.
- [60] Chance, B. & Williams, G. R. [1956] in Advances in Enzymology [Nord, F. F., ed.] vol. XVIII, pp. 65 - 134, Interscience Publishers Inc., New York, London.

- [61] Sies, H. [1977] in Abstracts 10th International Congress of Biochemistry, Hamburg, Nr. 06 - 7 - 129.
- [62] Hassinen, J. & Ylikari, R. H. [1970] Biochem. Biophys. Res. Comm. 338, 1091 - 1098.
- [63] Chappell, J. B. [1969] in: Inhibitors-Tools in Cell Research [Bücher, Th. & Sies, H., eds.] pp. 335 - 347, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [64] Siliprandi, D., Tominelli, A., Zoccorato, F. & Bindoli, A. [1975] FEBS Lett. 51, 15 - 17.
- [65] Thurman, R. G. & Scholz, R. [1969] Eur. J. Biochem. 10, 459 - 467.
- [66] Sies, H., Summer, K. H. & Bücher, Th. [1975] FEBS Lett. 54, 274 - 278.
- [67] Lyakhovi, V. V. [1973] Biokhimiya 38, 897 - 899.
- [68] Meister, A. [1975] in Metabolic Pathways, vol. VII, pp. 102 - 188, Academic Press, New York, San Francisco, London.

Enzyme

Alkohol-Dehydrogease	EC 1.1.1.1.
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	EC 1.1.1.49.
Glutamat-Dehydrogenase	EC 1.4.1.3.
Glutathion-Peroxydase	EC 1.11.1.9.
Glutathion-Reduktase	EC 1.6.4.2.
Hexokinase	EC 2.7.1.1.
Lactat-Dehydrogenase	EC 1.1.1.27.

Abkürzungen

ECR:	Extrazellulärraum
EDTA:	Äthylendiamintetraessigsäure
DTNB:	5,5'-Dithiobis[2-Nitrobenzoesäure
t-BOOH:	tert-Butylhydroperoxyd
KG:	Körpergewicht

Meinem hochgeschätzten Lehrer, Herrn Priv. Doz. Dr. Helmut Sies danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Beratung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher zolle ich großen Dank für lehrreiche Diskussionen.

Für kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre im Labor sowie die gute Zusammenarbeit bei Messungen danke ich Herrn Karl-Heinz Summer sowie Frau Ingrid Linke und Frau Annegret Marklstorfer.

Lebenslauf

Geboren am 25. 1. 1951 in Planegg als Tochter des Postbeamten Franz Gerstenecker und seiner Ehefrau Martina, geb. Bader.

Besuch der Volksschule von 1957 - 1961, anschließend Besuch des Vöhl-Gymnasiums in Memmingen. Dort 1969 Ablegung der Reifeprüfung.

Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Wintersemester 1969/70.

Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung nach dem Sommersemester 1970.

Ablegung der ärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 1971/72.

Im Mai 1972 Beginn der Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation bei Herrn Priv. Doz. Dr. Sies am Institut für Physiologische Chemie und Biochemie der Universität München.

Ablegung des Medizinischen Staatsexamens an der Universität München am 16. 6. 1975.

Erteilung der Approbation als Arzt am 17. 1. 1977.

